

TESIS DE MÁSTER

Transformación genética de *Neochloris
oleoabundans* S.Chantanachat & H.C.
Bold (Clorofita) mediada por
Agrobacterium tumefaciens.

Ziortza Ikarán Zugazaga
Curso 2010-11

Departamento de Producción Agraria
Nekazaritzako Ekoizpen Saila

Campus de Arrosadía / Arrosadiko Campusa
31006 Pamplona - Iruña (Navarra - Nafarroa)
Tel.: 948 16 9100 - Fax: 948 16 9732
secretaria.produccion.agraria@unavarra.es



El **Dr. Jon VERAMENDI CHAROLA**, Profesor Titular del Área de Producción Vegetal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra, como tutor de Ziortza Ikarán Zugazaga

INFORMA

Que la presente memoria de Tesis de Master "*Transformación genética de Neochloris oleoabundans S.Chantanachat & H.C. Bold (Clorofita) mediada por Agrobacterium tumefaciens*" elaborada por Dña. Ziortza Ikarán Zugazaga ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Sonia Castañón de la Torre y cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para ser presentada y defendida.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Pamplona a treinta y uno de enero de 2011.

A handwritten signature in black ink, which appears to be 'J. Veramendi', is centered below the text.

Dr. JON VERAMENDI CHAROLA

1.	Introducción.....	1
1.1.	Interés comercial de las microalgas.....	1
1.2.	<i>Neochloris oleoabundans</i>	3
1.3.	Transformación genética en microalgas	4
1.4.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> como sistema de transformación de sistemas vegetales	6
2.	Objetivo.....	7
3.	Material y Métodos.....	7
3.1.	<i>N. oleoabundans</i>	7
3.2.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> y vectores de transformación.....	8
3.3.	Transformación genética de <i>N. oleoabundans</i>	9
3.3.1.	<i>N.oleoabundans</i>	10
3.3.2.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
3.3.3.	Proceso de infección.....	10
3.3.4.	Selección de transformantes	11
3.4.	Estudio de la integración estable del T-DNA.....	12
3.4.1.	Capacidad de crecimiento en presencia del agente de selección	12
3.4.2.	Determinación molecular del T-DNA	12
3.5.	Detección del gen informador <i>gfp</i>	14
3.5.1.	Inmunodetección por western Blot.....	14
3.5.2.	Detección por microscopía	14
4.	Resultados	14
5.	Discusión.....	20
6.	Bibliografía.....	24

Abstract

This work presents the results obtained in the development of a transformation protocol for the microalgae *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyceae) using *Agrobacterium tumefaciens*.

The binary vector pGJ2798 harbouring a *nptII* selection gene, which confers resistance to aminoglycoside antibiotics, and a *gfp* reporter gene that encodes the GFP protein (green fluorescent protein), was used for transformation.

In order to develop the transformation protocol, on one hand successive experiments were conducted in which we evaluated the effect of different factors potentially involved in successful transformation, such as co-culture period (24, 48 and 72 hours), temperature (22 and 25 °C), irradiation (darkness / photoperiod of 16 hours) during co-culture period, and medium used during infection. On the other hand, to increase the virulence of *A. tumefaciens*, acetosyringone was added to the bacterial culture at two final concentrations.

Results showed that irradiation during co-culture is a determining factor for successful infection, yielding an efficiency of 30 colonies per million cells seeded, of which 82% maintained their resistance to the antibiotic of choice for at least one year.

PCR was used to successfully amplify fragments of the *nptII* (654bp) and *gfp* (524 bp) genes from genomic DNA of transformed cells, confirming the transgenic nature of these colonies. However, no GFP protein was detected in transformed colonies.

Resumen

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos en el desarrollo de un protocolo de transformación de la microalga *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyceae) empleando *Agrobacterium tumefaciens*.

Para la transformación se empleó el plásmido binario pGJ2798, portador del gen de selección *nptII*, que confiere resistencia a antibióticos aminoglicosilados y el gen informador *gfp* que codifica la proteína GFP (green fluorescent protein).

Para el desarrollo del protocolo se realizaron experimentos sucesivos en los que se evaluó el efecto de diferentes factores potencialmente implicados en el éxito de la transformación, como son el periodo de cocultivo (24, 48 y 72 horas), la temperatura (22 y 25°C), la irradiación (oscuridad / fotoperiodo de 16 horas) durante el periodo de cocultivo, y el tipo de soporte empleado durante la infección. Por otro lado, y con el fin de aumentar la virulencia de *A.tumefaciens* se emplearon dos concentraciones de acetosirigona en el cultivo bacteriano.

Los resultados mostraron que la irradiación durante el periodo de cocultivo es un factor determinante para el éxito de la infección, obteniéndose una eficiencia de 30 colonias por millón de células sembradas, de las cuales un 82% mantiene el fenotipo de resistencia al antibiótico de selección durante al menos un año.

La verificación molecular de transformantes mediante PCR permitió amplificar dos fragmentos de 654 y 524 pares de bases correspondientes a los genes *nptII* y *gfp* confirmando el carácter transgénico de las colonias obtenidas. No obstante, no se pudo detectar la proteína GFP en las colonias transformadas.

1. Introducción

1.1. Interés comercial de las microalgas

Las microalgas comprenden un amplísimo y heterogéneo grupo de microorganismos eucariotas y procariotas, unicelulares y coloniales, que comparten la característica común de ser fotoautótrofos. Su elevada capacidad de adaptación se refleja en su distribución ecológica, pudiendo encontrarlas en prácticamente cualquier hábitat. Debido a su gran diversidad, estos organismos se han convertido, como grupo, en fuente de un amplísimo rango de compuestos químicos con aplicaciones alimenticias, nutracéutica, farmacéuticas, cosméticas e incluso energéticas (Tabla 1).

Tabla 1. Aplicaciones comerciales actuales de las microalgas (Becker, 1994)

Mercado	Finalidad
Alimentación humana	Suplemento proteico
Pienso	Suplemento proteico pienso alimentación porcina, pienso acuicultura, alimentación alevines, moluscos y bivalvos.
Nutracéutica	Compuestos funcionales con beneficios para la salud humana: antioxidantes, ácidos grasos Omega 3, pro-vitaminas.
Pigmentos	Coloración natural de salmónes: Axtasantina Colorantes alimenticios: B-caroteno
Farmacéutica/ Terapéutica	Antitumorales, antibióticos, enzimas, protectores solares, moduladores colesterol,...
Química Fina	Glicerol, Ácidos grasos, aminoácidos, polisacáridos (espesantes), vitaminas C y E, ...
Bioenergía	Biodiesel, Biogas, Bioetanol, Biomasa

En la actualidad existen más de 40.000 especies de microalgas identificadas. Cientos de ellas han sido objeto de estudio a nivel fisiológico, metabólico o químico, sólo unas pocas decenas han sido cultivadas fuera del laboratorio, y muy pocas de ellas han llegado a producirse a escala industrial.

El cultivo masivo con fines comerciales se inició en Japón y en América hace algo más de 50 años, con la producción de las especies *Chlorella* y *Spirulina*. Debido a su perfil nutricional, caracterizado por un elevado contenido proteico, aporte de vitaminas y minerales, y al sencillo manejo de su cultivo, estas dos especies han dominado el mercado de la alimentación desde entonces (Becker, 2004; Pulz & Gross 2004).

Además de su potencial como suplemento proteico para consumo humano y animal, muchas especies marinas se utilizan actualmente para la alimentación de moluscos, crustáceos y fases larvarias de algunas especies de peces, siendo de interés estratégico para la acuicultura (Muller-Freuga, 2004). Su trascendencia en este sector se debe de nuevo al perfil nutricional, principalmente por el elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados tipo omega 3 que ofrecen algunas especies (Becker, 2004).

El continuo desarrollo de las técnicas de cultivo, unido al conocimiento de que muchas especies son fuente de valorados productos naturales, han permitido diversificar las aplicaciones de las microalgas, fomentando su explotación para aplicaciones biotecnológicas e impulsando su desarrollo comercial a mayor escala (Cardozo *et al.*, 2007). De hecho, actualmente la principal importancia económica de las microalgas se debe a la capacidad de algunas especies de almacenar biomoléculas de reconocido valor económico, bajo determinadas condiciones de cultivo. Un ejemplo claro es la obtención de pigmentos naturales de elevado valor comercial, como la Axtasantina y el β -caroteno producidos por las especies *Haematococcus pluvialis* y *Dunaliella salina*, respectivamente. Estos pigmentos poseen además una elevada actividad antioxidante, y también han adquirido una gran importancia como ingredientes funcionales en el mercado de la nutraceutica (Spolaore *et al.*, 2006).



Figura 1. Planta de producción de microalgas de la empresa Cyanotech Corp. en Hawaii. Los tanques verdes corresponden a cultivos de *Spirulina* (producción de pigmento ficocianina) y los rojos a cultivos de *Haematococcus pluvialis* (producción del pigmento astaxantina). A la derecha detalle del tanque de cultivo de *H. pluvialis*

Más recientemente, la producción de microalgas ha cobrado un marcado interés en el campo de la bioenergía principalmente para la obtención de biocombustibles como biodiesel y bioetanol. La razón de este interés radica en las elevadas productividades por unidad de superficie que se obtienen con estos cultivos (superiores a las de la mayoría de los cultivos terrestres) y en la capacidad que tienen muchas especies de acumular elevadas cantidades de aceites muy similares a los que almacenan las semillas de cultivos oleaginosos terrestres (Chisti *et al.*, 2007). El empleo de cultivos de microalgas para obtención de biocarburantes eliminaría la controversia generada actualmente por derivar productos alimenticios hacia la obtención de energía. Los lípidos procedentes de las microalgas prometen ser el futuro para una producción sostenible de biodiesel (Chisti, 2007; Li, 2008; Liu *et al.*, 2008).

Por tanto, la producción de microalgas es actualmente una industria en pleno desarrollo. Con el creciente interés por estos microorganismos, tanto para aplicaciones biotecnológicas como para obtención de bioenergía, ha surgido la demanda de obtener cepas mejoradas, que ofrezcan mayores tasas de crecimiento y mayores concentraciones de los compuestos de interés (Olaizola, 2003; Song *et al.*, 2008). La ingeniería genética se presenta como una de las herramientas moleculares que permitirán la mejora de especies.

1.2. *Neochloris oleoabundans*

Neochloris oleoabundans es una clorofita de agua dulce perteneciente a la familia Chlorococcaceae.

Existen numerosas evidencias del valor nutricional de esta especie para su empleo en acuicultura (Gatenby *et al.*, 2003). Sin embargo, el reciente interés que ha adquirido esta especie se relaciona con la obtención de bioenergía, concretamente de biodiesel (Lan & Wang, 2009), y se debe a su capacidad para almacenar elevadas cantidades de aceite. En condiciones estándar de crecimiento, *N. oleoabundans* contiene alrededor de 30% de lípidos respecto a su peso seco. No obstante, bajo determinadas condiciones de cultivo puede llegar a acumular hasta un 54% de lípidos en su citoplasma, de los que el 80% están como triglicéridos (Tornabene *et al.*, 1983). Por otro lado, *N. oleoabundans* muestra un elevado contenido en ácidos grasos saturados de 16–20 carbonos en su perfil lipídico, tal como es requerido para la

conversión a biodiesel, lo que la convierte en una de las especies de microalgas más adecuadas para este fin (Li *et al.*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009).

Al igual que ocurre con otras especies de microorganismos oleaginosos, el almacenamiento de aceites en microalgas requiere de un estricto control metabólico, pero el conocimiento de las rutas metabólicas responsables de la oleogenia en microalgas es muy reducido. El empleo de herramientas genéticas que permitan conocer y mejorar las características metabólicas de estas especies se ha propuesto como una de las necesidades indispensables para que la tecnología del biodiesel de microalgas llegue a ser viable (Rosenberg *et al.*, 2008, Radakovits *et al.*, 2010).

1.3. Transformación genética en microalgas

Los procesos biotecnológicos para la obtención de microalgas transgénicas aún están en sus etapas iniciales, pero el creciente interés de las aplicaciones industriales que esta tecnología ha despertado ha permitido un rápido desarrollo durante la última década. Así se han establecido bases de datos de ESTs, obtenido las secuencias genómicas completas de varias especies de microalgas y se han desarrollado con éxito técnicas de transformación nuclear y plastidial (León-Bañares *et al.*, 2004; Radakovits *et al.*, 2010). Mediante modificaciones genéticas que incluyen la inserción de un gen concreto alterando rutas metabólicas fundamentales, se ha conseguido convertir la especie estrictamente fotoautótrofa *Phaeodactylum tricornutum*, en heterótrofa (Zaslavskaja *et al.*, 2001).

El desarrollo de la mayoría de las herramientas moleculares para la ingeniería genética de microalgas se basa en la clorofita *Chlamydomonas reinhardtii*, primera especie transformada con éxito a nivel plastidial y nuclear (Boynton *et al.*, 1988; Fernandez *et al.*, 1989; Debuchy *et al.*, 1989). Desde entonces se han producido importantes avances en relación a los marcadores selectivos, promotores y técnicas de transformación. Actualmente podemos disponer de más de treinta especies de algas de diferentes grupos taxonómicos que han sido transformadas con éxito (Radakovits *et al.*, 2010), muchas de ellas clorofitas (Tabla 2). No obstante, la estabilidad de los transgenes sigue siendo un problema en muchas de las transformaciones (León-Bañares *et al.*, 2004).

Tabla 2. Especies de clorofitas transformadas y método empleado.

Especie	Método	Genoma	Transf.	Referencia
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	Kindle <i>et al.</i> , 1989
	Bombardeo	Cloroplast	Pasajera	Boynton, <i>et al.</i> , 1988
	Glass beads	Nuclear		Kindle, 1990
	Whiskers de carburo silícico	Nuclear		Dunahay <i>et al.</i> , 1993
	Electroporación	Nuclear		Shimogawara <i>et al.</i> , 1998
	Agrobacterium	Nuclear	Estable	Kumar <i>et al.</i> , 2004
<i>Volvox carteri</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	Schiedlmeier <i>et al.</i> , 1994
<i>Dunaliella salina</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	Lü <i>et al.</i> , 2005; Tan <i>et al.</i> , 2005
	Electroporación	Nuclear	Estable	Sun <i>et al.</i> , 2005;
<i>Dunaliella viridis</i>	Electroporación	Nuclear	Estable	Sun <i>et al.</i> , 2006
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	Steinbrenner & Sandmann, 2006
	Agrobacterium	Nuclear	Estable	Kathiresan <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	Dawson <i>et al.</i> , 1997
<i>Chlorella kessleri</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	El-Sheekh., 1999
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Bombardeo	Nuclear	Pasajera	Jarvis & Brown, 1991
<i>Chlorella saccharophila</i>	Electroporación	Nuclear	Pasajera	Maruyama <i>et al.</i> , 1994
<i>Chlorella vulgaris</i>	Electroporación	Nuclear	Pasajera	Chow & Tung, 1999

Existen cuatro métodos de transformación que permiten introducir genes de interés, a nivel nuclear o plastidial, en microalgas:

- Bolas de vidrio o whiskers de carburo silícico: es el método de transferencia más sencillo y consiste en agitar una suspensión celular en presencia de DNA y bolas de vidrio o whiskers de carburo silícico de forma que por la acción abrasiva se crean poros transitorios en la membrana plasmática permitiendo la entrada del DNA en el interior de la célula.
- Electroporación: aplicación de pulsos de corriente eléctrica que generan la apertura de poros transitorios en la membrana de modo que la intensidad, duración y número de pulsos permiten controlar la eficiencia de entrada del DNA exógeno.
- Bombardeo de microprojectiles (biolística): el DNA recubre partículas de metal (oro o tungsteno) que son disparadas sobre las células de interés impulsadas mediante helio a alta presión.

- *Agrobacterium tumefaciens*: la bacteria *A. tumefaciens* es un método común de transformación en plantas, ya que es capaz de transferir una parte de su genoma, el DNA transferente (T-DNA), en el genoma nuclear de las células. Los genes inductores de tumores del T-DNA silvestre son sustituidos por genes de interés.

El empleo del sistema de transformación mediante *A. tumefaciens* en microalgas ofrece destacables ventajas frente a otras técnicas empleadas hasta el momento. En primer lugar no requiere generar protoplastos o mutantes sin pared, y por tanto mejora la viabilidad de las células. Por otro lado, garantiza la integración del material genético en el genoma nuclear, facilitando su expresión estable en las células.

1.4. *Agrobacterium tumefaciens* como sistema de transformación de sistemas vegetales

El estudio de la biología de *A. tumefaciens*, junto con el desarrollo de la ingeniería genética y su aplicación a la biología vegetal, han revolucionado la agricultura y contribuido al crecimiento de la industria biotecnológica. La habilidad de los sistemas vegetales para integrar y expresar genes foráneos ha posibilitado la obtención de cultivos genéticamente modificados con diferentes aplicaciones. Como ya se ha comentado anteriormente, el creciente interés de las microalgas en la industria hace necesaria la aplicación de las herramientas biotecnológicas en la búsqueda y consecución de cepas mejoradas.

A. tumefaciens es capaz de infectar células vegetales y transferir una porción concreta de su propio DNA, en T-DNA. El T-DNA está localizado en el plásmido inductor de tumores (plásmido Ti), que además contiene los genes de virulencia (genes *vir*) necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de DNA en el genoma de la planta. Además de estos genes *vir*, para que la transferencia se lleve a cabo se requieren las secuencias borde del T-DNA, lo que hace posible la sustitución de los genes bacterianos por otros genes de interés (Valderrama *et al*, 2005). La posibilidad de que los genes *vir* y el T-DNA se encuentren en diferentes plásmidos (TRANS), da lugar a los sistemas binarios, donde los genes *vir* se encuentran en la cepa desarmada de *Agrobacterium* y el T-DNA en el vector binario (Hellens & Mullineaux, 2000). Los vectores binarios presentan características

comunes (Lee & Gelvin, 2008) como son los bordes derecho e izquierdo que delimitan el T-DNA, secuencias repetidas, palindrómicas e invertidas (RB y LB), un gen de selección bacteriano, el gen de selección vegetal, que permite la identificación y selección de las células transformadas, y orígenes de replicación para *E. coli* y *A. tumefaciens*. Además, presentan secuencias únicas de restricción dentro del T-DNA que permiten clonar los genes de interés junto con el promotor y terminador adecuados.

La **eficiencia de la transformación** se mide por el número de plantas obtenidas después de la infección con *A. tumefaciens*. La transformación genética depende, según Birch (1997), de que se cumplan una serie de requerimientos tanto biológicos como prácticos. Las células vegetales difieren en su capacidad para responder a señales externas, fenómeno que algunos autores denominan competencia. Las células con potencial para producir plantas transgénicas han de ser competentes no sólo para la regeneración, sino para la transformación integrativa. En los tejidos vegetales organizados, sólo una mínima parte de las células son competentes para ambos procesos, mientras que el resto, si bien es capaz de responder adecuadamente al tratamiento, inicialmente sólo son competentes para uno de los dos procesos. Recientemente se ha demostrado que las microalgas también pueden ser transformadas mediante *A. tumefaciens* (Kumar *et al.*, 2004; Kathiresan *et al.*, 2009) y por tanto estos organismos exhiben la característica de ser competentes, tanto para la infección como para regeneración de colonias a partir de la célula transformada.

2. Objetivo

El objetivo de esta Tesis de Master es diseñar y establecer un protocolo de transformación genética estable para la microalga verde *Neochloris oleoabundans*, empleando *Agrobacterium tumefaciens* como sistema para la transferencia de genes de interés.

3. Material y Métodos

3.1. *N. oleoabundans*

N. oleoabundans (Chlorophyceae) se adquirió al Banco Nacional de Algas (BNA) de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. La cepa se activó por transferencia desde medio sólido a medio Bold Basal (MBB) (Andersen, 2005)

líquido, y fue cultivada en cámara de cultivo a 22 °C con agitación orbital (100 rpm), con una irradiación de 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo 16 horas de luz.

3.2. *Agrobacterium tumefaciens* y vectores de transformación

Para los experimentos se emplearon las cepas desarmadas AGL1, EHA105 y LBA4404, adquiridas en la CECT (Colección española de cultivos tipo).

Las características de las tres cepas se describen en la tabla 3. Las cepas, conservadas en glicerol 25% a - 80°C, se transfirieron a placas con medio de cultivo Luria Broth (LB) (Sambrook *et al.*, 1989).

Tabla 3: Cepas desarmadas de *A. tumefaciens* empleadas en los ensayos de transformación.

Cepa	Origen del cromosoma	Derivación del plásmido Ti	Resistencia al antibiotico ^a	Referencia
AGL1	C58	pTio542 (succinamopina)	Rif, Carb	Lazo <i>et al.</i> , 1991
EHA105	C58	pTio542 (succinamopina)	Rif	Hood <i>et al.</i> , 1986
LBA4404	Ach5	pTiAch5 (octopina)	Rif	Ooms <i>et al.</i> , 1982

^a Rif, rifampicina; Carb, carbenicilina

Como vector binario se empleó el plásmido pGJ2798 cedido por el Dr. G. Jach (Max Planck Institute, Colonia, Alemania) y portador del gen *gfp* que codifica la proteína GFP (green fluorescent protein) regulado por el promotor constitutivo *CaMV35S* (virus del mosaico de la coliflor). Como gen de selección incluye el gen *nptII* (neomicina fosfotransferasa), que confiere resistencia frente a antibióticos aminoglucósidos como la kanamicina y se encuentra bajo el control del promotor *nos* (nopalina sintasa). El plásmido, además, contiene el gen *aadA* (estreptomicina 3'-adeniltransferasa) para la selección bacteriana que confiere resistencia a los antibióticos espectinomomicina y estreptomicina (figura 2).

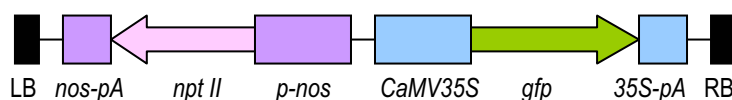


Figura 2: Mapa del T-DNA del plásmido binario pGJ2798.

El vector pGJ2798 fue replicado en *E. coli* DH5 α . La extracción del plásmido se realizó mediante el kit PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) y la concentración final se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000.

La transferencia del plásmido pGJ2798 a las cepas de *A. tumefaciens* se realizó mediante electroporación, empleando un MicroPulser™ de BIORAD (Lin, 1995). Para la preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium*, se inoculó una colonia aislada en 100 mililitros de medio de cultivo con los antibióticos apropiados y se incubó a 28° C a 180 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5. Una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial se mantuvo el cultivo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. El pellet se lavó tres veces con 50 mililitros de glicerol (10%) frío y finalmente se resuspendió en 1 ml de glicerol (10%). Una alícuota de 40 μ l se empleó para la transformación.

Las células electroporadas se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo y se incubaron durante 4 horas a 28° C y 180 rpm. Tras la incubación, las células se sembraron en LB agar suplementado con Rifampicina (25mg/l), Carbemecilina (100mg/l) y Estreptomicina (100mg/l) en el caso de AGL1 y con Rifampicina (25mg/l) y Estreptomicina (100mg/l) en el caso de las cepas EHA105 y LBA4404, y se incubaron durante 48 horas a 28°C.

La presencia del plásmido pGJ2798 en las colonias transformadas se analizó mediante amplificación por PCR del gen *gfp* empleando cebadores específicos.

3.3. Transformación genética de *N. oleoabundans*

Para el desarrollo del protocolo de transformación genética de *Neochloris* se realizaron 3 experimentos sucesivos en los que se ensayaron los siguientes factores: (1) el tipo de cultivo de partida de *Neochloris* (líquido o cultivo sobre agar), (2) el medio de cultivo para el crecimiento de *Agrobacterium* previo a la infección, (3) el soporte empleado para el co-cultivo microalga - *Agrobacterium* y (4) el tiempo y las condiciones del cocultivo.

Los tiempos de cocultivo ensayados fueron 24, 48 y 72 horas. En cuanto a las condiciones de cocultivo, se emplearon dos temperaturas (22 y 25°C) y dos condiciones de irradiación (oscuridad y fotoperiodo 16 horas luz).

Para simplificar el entendimiento, la combinación de condiciones empleadas en los tres experimentos se resume en la tabla 4.

3.3.1. *N.oleoabundans*

Se emplearon dos tipos de cultivos de *N.oleoabundans* como material de partida para la infección, cultivos líquidos y cultivos sobre agar.

(a) cultivos líquidos.

Una alícuota de *N. oleoabundans* procedente de un cultivo líquido en fase de crecimiento exponencial se diluyó con MBB fresco hasta obtener una concentración celular de $1-1.5 \times 10^6$ cel/ml.

(b) cultivos sobre agar.

Una alícuota de *N. oleoabundans* procedente de un cultivo líquido en fase de crecimiento exponencial en MBB fresco que contenía 5×10^5 células, se sembró sobre el medio Tris Acetato Fosfato (TAP) (Andersen, 2005) con agar 15%. Las placas sembradas se incubaron en cámara de cultivo a 22°C, con una irradiación de $80 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 horas de luz, hasta la formación de un césped de células.

3.3.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Las diferentes cepas de *A. tumefaciens* portando el plásmido pGJ2798 se cultivaron en LB suplementado con los antibióticos de selección correspondientes, durante 48 horas a 28°C y 180 rpm.

Previamente a la infección, *Agrobacterium* se cultivó en un medio de inducción (MI) con el fin de aumentar su virulencia. Los cultivos se centrifugaron y resuspendieron en MI hasta alcanzar una DO_{600} de 0.2. Este MI fue idéntico en composición al medio empleado para el crecimiento, pero suplementado con acetosiringona (AS). Para la realización de los experimentos se ensayaron dos combinaciones de acetosiringona y pH final: (a) AS 100 μM y pH 7 y (b) AS 200 μM y pH 5.8. En ambos casos, las suspensiones bacterianas se cultivaron a 28°C y 180 rpm durante 4-5 horas hasta alcanzar una DO_{600} 0.5-0.6. Una vez alcanzada la densidad óptica, se retiró el medio de inducción, se lavó el pellet obtenido con agua destilada y se resuspendió en el mismo volumen de medio TAP suplementado con AS 200 μM .

3.3.3. Proceso de infección

El proceso de infección se llevó a cabo mediante cocultivo de *Agrobacterium* y *N.oleoabundans*, empleando dos soportes diferentes en los diferentes experimentos de transformación realizados.

(a) Filtros de nitrocelulosa.

El cocultivo se realizó empleando 1 ml del cultivo de *N. oleoabundans* y 1ml de cultivo de *A. tumefaciens*, tal y como se describen ambos en los apartados 3.3.1 y 3.3.2, que fueron filtrados conjuntamente a través de un filtro Whatman de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro. El filtro con ambos organismos fue cultivado en un medio sólido TAP suplementado con AS 200 μM . Las condiciones y tiempos de cultivo se modificaron en los diferentes ensayos realizados (tabla 4). Como control negativo, se empleó un cultivo de *N. oleoabundans* sin infectar y sometido al mismo proceso.

(b) Césped de *N. oleoabundans* cultivado en medio sólido

El ensayo se realizó cocultivando un césped de *N. oleoabundans* crecido en medio sólido y 200 μl del cultivo de *A. tumefaciens*, tal y como se describen ambos en el apartado 3.3.1 y 3.3.2. El cocultivo se realizó durante 48 horas, en cámara de cultivo a 22°C, con una irradiación de 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 horas de luz. Como control negativo, se empleó un césped de *N. oleoabundans* sin infectar y sometido al mismo proceso.

3.3.4. Selección de transformantes

Transcurrido el tiempo de cocultivo las células contenidas sobre los filtros o en su lugar las placas de infección se resuspendieron en MBB con cefotaxima (500mg/l) y se incubaron en agitación durante 30 minutos. A continuación se lavaron 3 veces con agua destilada y se sembraron sobre placas de MBB suplementado con cefotaxima (500mg/l) y kanamicina (100mg/l). Las placas se mantuvieron a 22°C, 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiodo 16 horas de luz, hasta la aparición de colonias.

Para determinar la sensibilidad de *Neochloris oleoabundans* frente al antibiótico de selección kanamicina, se sembraron 10^6 células en MBB en presencia de kanamicina a concentraciones de 0, 50, 100 y 200 mg/l.

La frecuencia de transformación se calculó teniendo en cuenta el número de colonias transformadas respecto al número de células empleadas para la infección.

Tabla 4: Cepas empleadas, características del medio de inducción y condiciones de cultivo utilizadas para cada ensayo de transformación

Ensayo	Cepa	Medio Inducción			Condiciones de co-cultivo				
		OD ₆₀₀	AS (μM)	pH	Soporte	Medio	Temp (°C)	Tiempo (horas)	Luz/Osc
1	AGL1	0.5	100	7	Filtro	TAP + AS	22	24	O
								48	
								72	
	EHA105	0.3	100	7	Filtro	TAP + AS	22	24	O
								48	
								72	
	LBA4404	0.3	100	7	Filtro	TAP + AS	22	24	O
								48	
								72	
2	AGL1	0.5	200	5.8	Filtro	TAP + AS	22 25	48	O
3	AGL1	0.6	200	5.8	Agar	TAP	22	48	L

3.4. Estudio de la integración estable del T-DNA

3.4.1. Capacidad de crecimiento en presencia del agente de selección

Las colonias que crecieron en medio de selección se sembraron en medio fresco MBB con cefotaxima (500mg/l) y kanamicina (100mg/l) cada 3-4 semanas.

Asimismo las colonias se activaron en 10 mililitros de MBB líquido suplementado con cefotaxima (500mg/l) y kanamicina (100mg/l), y se dejaron crecer hasta alcanzar una concentración celular de aproximadamente 5×10^6 cel/ml.

3.4.2. Determinación molecular del T-DNA

Para la extracción de DNA se emplearon los cultivos crecidas en MBB líquido con cefotaxima (500mg/l) y kanamicina (100mg/l), según se describe en el apartado anterior. Las células se recolectaron por centrifugación, los pellet se lavaron con agua destilada y a continuación se liofilizaron. Una vez liofilizados las células se congelaron con nitrógeno líquido y se rompieron mediante abrasión mecánica. La extracción de DNA se realizó utilizando el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,7% de las extracciones para comprobar el estado del DNA obtenido. La concentración y la pureza del DNA se verificaron mediante espectrofotometría, empleando un NanoDrop 2000.

Del mismo modo se extrajo DNA de un cultivo de *N. oleoabundans* sin transformar, que se empleó como control negativo en las amplificaciones para la verificación de la integración del T-DNA.

Para verificar la integración del T-DNA en el genoma de las algas, se emplearon cebadores específicos para los genes *gfp* y *nptII* así como cebadores localizados en el promotor y el terminador 35S.

Las secuencias de los cebadores utilizados y los tamaños esperados para cada fragmento amplificado se muestran en la tabla 5. Las condiciones de la reacción de PCR empleadas para la amplificación de cada fragmento se muestran en la tabla 6.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa mediante tinción con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen).

Para descartar presencia de *Agrobacterium* en las colonias crecidas tras la transformación, se realizó la amplificación del gen *aadA* utilizando cebadores específicos (Clark et al, 1998).

Tabla 5: Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los genes *gfp*, *nptII* y el del promotor y terminador 35S junto con los tamaños esperados en pares de bases (pb) de la amplificación para cada combinación.

Gen	Cebadores	Secuencia (5'→3')	Tamaño esperado (pb)
<i>GFP</i>	GFPFor3	TGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAA	524
	GFPRev3	GGTCTGCTAGTTGAACGCTTCCATC	
<i>nptII</i>	NPTIIFor2	GTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCA	654
	NPTIIRev2	TGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTA	
35S	35SFor	ATCCTTCGCAAGACCCTTCC	940
	T35SRev	AGAGAGAGATAGATTTGTAGAGA	

Tabla 6: Los tiempos, las temperaturas y el número de ciclos del programa de PCR para los genes, *gfp*, *nptII* y el promotor 35S.

Gen	1 ciclo	35 ciclos	1 ciclo
<i>gfp</i>	94°C → 4'	94°C→ 30'', 54°C→30'', 72°C →1'	72°C→ 7'
<i>nptII</i>	94°C → 4'	94°C→ 30'', 60°C→30'', 72°C →1'	72°C→ 7'
35S	94°C → 4'	94°C→ 30'', 50°C→30'', 72°C →1,30'	72°C→ 7'

3.5. Detección del gen informador *gfp*

3.5.1. Inmunodetección por western Blot

Para la extracción de la proteína soluble se cosecharon 15 mililitros de cultivo mediante centrifugación, los pellet se resuspendieron en PBS (NaCl 0,14 M; KH₂PO₄ 1,5 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM) y se sonicaron durante 10 minutos a 30% de amplitud. Las muestras se hirvieron a 95°C en un tampón de disociación (Tris-HCl 250 mM (ph 6.8), SDS al 8%, glicerol 35%, β-mercaptoetanol 2.5% y azul de bromofenol 0.005%) y se migraron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% (Laemmli, 1970). Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia en semiseco (Trans-Blot SD, BioRad) y la membrana se bloqueó en PBST (PBS; 0.05% Tween 20) con leche en polvo al 5%, durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. A continuación se incubó durante 2 horas con el anticuerpo monoclonal específico contra la GFP (Invitrogen) en una dilución 1:1000 en PBST con leche en polvo. Tras lavar la membrana 3 veces con PBST, se añadió un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (dilución 1:1000) durante 1 hora en agitación. Una vez realizados los lavados con PBST y PBS, se añadió el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (PIERCE) y se reveló según las instrucciones del kit.

3.5.2. Detección por microscopía

Para detectar la señal de fluorescencia de la proteína GFP, las células procedentes de colonias transformadas se observaron por microscopía de fluorescencia, empleando un microscopio Nikon Eclipse 50i, equipado con una fuente de excitación (520 -585 nm), y filtros de emisión de 510nm (fluorescencia verde) y 520nm LP (fluorescencia verde – roja).

4. Resultados

El objetivo de este trabajo fue diseñar y establecer un protocolo de transformación genética estable para la microalga verde *N. oleoabundans*, empleando *Agrobacterium tumefaciens* como sistema para la transferencia de genes de interés.

El vector binario pGJ2798 empleado para la transformación genética de *N. oleoabundans*, contiene un gen informador que codifica la proteína fluorescente GFP y un gen de selección que confiere resistencia frente a antibióticos aminoglucósidos como la kanamicina.

Para el desarrollo del protocolo de transformación genética de *N. oleoabundans* se realizaron diferentes experimentos en los que se ensayaron varios factores, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos de esta memoria.

Los resultados de frecuencia de transformación, en base a la aparición de colonias resistentes tras la infección con *A. tumefaciens* fueron diferentes en los sucesivos experimentos realizados (Tabla 7).

Inicialmente, se ensayaron diferentes cepas de *A. tumefaciens* con el fin de determinar la eficiencia de infección de las mismas frente a los cultivos de microalgas. Se emplearon las cepas de *A. tumefaciens* AGL1, EHA105 y LBA4404, bajo las condiciones descritas en la tabla 4 de material y métodos. El resultado mostró una frecuencia de transformación inferior a 1 transcurridas dos semanas desde la infección. Las colonias aparentemente transformadas, se obtuvieron empleando las cepas AGL1 y EHA105 y un periodo de cocultivo de 48 horas. El proceso de infección se realizó sobre filtros de nitrocelulosa. El resto de condiciones ensayadas no dieron lugar a colonias transformadas.

Las colonias obtenidas tras la infección con la cepa AGL1 mostraron resistencia frente al antibiótico de selección durante los subcultivos continuados a lo largo de 1 año. Por el contrario, en el caso de las colonias obtenidas tras la infección con EHA105, el fenotipo de resistencia a kanamicina se perdió tras la primera resiembra.

Tras los resultados obtenidos de la primera batería de ensayos, se determinó que la cepa más adecuada para la transformación genética de esta especie era AGL1 y se estableció un periodo de cocultivo de 48 horas.

Con el objeto de mejorar la virulencia de la cepa AGL1 y potenciar la infección, se procedió a su cultivo acidificando el pH del medio de cultivo y duplicando la concentración de AS empleada. Paralelamente se ensayaron dos temperaturas de cocultivo, 22 y 25°C.

La modificación del medio de inducción de *A. tumefaciens* empleada en el siguiente experimento permitió incrementar la eficiencia de transformación en un

50% cuando el cocultivo se realizó a una temperatura de 22°C. El incremento de la temperatura de cocultivo a 25°C no mejoro la transformación, ya que no se obtuvo ningún aumento en la eficiencia de la misma. El 65% de las colonias obtenidas mostraron resistencia frente al antibiótico de selección durante subcultivos continuados a lo largo de 1 año.

Finalmente, y tras los resultados obtenidos, se ensayó una técnica de infección diferente a la basada en el empleo de filtros durante el cocultivo, tal y como se describe en materiales y métodos. En estos experimentos se empleó la cepa AGL1 y las condiciones de pH y AS óptimas descritas anteriormente (Tabla7). Por el contrario se modificó la presencia de irradiación durante el periodo de 48h de cocultivo. Bajo estas condiciones se incrementó de forma considerable la eficiencia de transformación, obteniéndose una media de frecuencia de 30 colonias por millón de células, que comenzaron a visualizarse a los 7 días desde la infección. (Figura 4A). El 82% de las colonias obtenidas conservan la resistencia frente al antibiótico de selección tras los subcultivos continuados (Figura 4B).

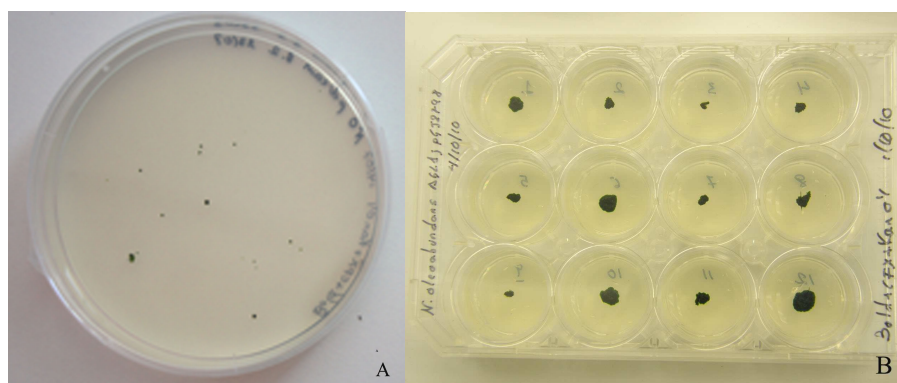


Figura 4: Colonias supuestamente transformadas, (A) obtenidas tras 15 días desde la infección con AGL1 y (B) subcultivadas de forma continuada en presencia del antibiótico de selección.

El estudio preliminar de sensibilidad de *N. oleoabundans* frente al antibiótico de selección reveló que la especie es intolerante a concentraciones iguales o superiores a 50 mg/l de kanamicina, no desarrollándose colonias en presencia del mismo durante más de dos meses. Este dato corrobora la validez de la kanamicina como agente de selección para esta especie y por tanto, el crecimiento de colonias, obtenidas tras los ensayos de transformación y en presencia del antibiótico de selección, nos da una primera aproximación al carácter transgénico de las mismas.

No obstante, y con el fin de determinar a nivel molecular la integración del T-DNA en el genoma de las células transformadas, se procedió a la amplificación de los genes *gfp* y *nptII*, tal y como se describe en material y métodos, a partir del DNA extraído de colonias obtenidas tras la infección.

La integración del gen *nptII* se determinó mediante PCR empleando los cebadores NPTIIFor2 y NPTIIRev2. Como resultado de la amplificación, se obtuvo un fragmento de 645 pb correspondiente al gen *nptII* en las colonias analizadas. (Figura 5A).

La integración del gen *gfp* se verificó empleando los cebadores GFPFor3 y GFPRev3. El resultado de la amplificación mostró un fragmento de 524 pb en la mayor parte de las colonias transformadas (Figura 5B).

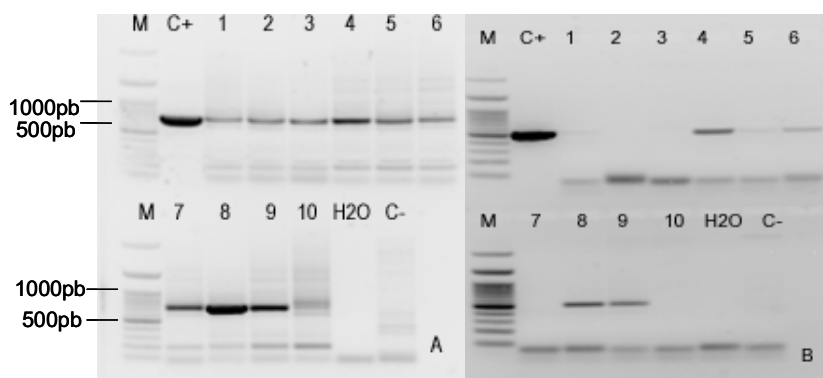


Figura 5: Detección de los genes *nptII* (A) y *gfp* (B) mediante amplificación por PCR en DNA extraído de colonias transformadas y obtenidas tras la infección con *A. tumefaciens*.: 1-10. DNA extraído de colonias transformadas; C+. vector binario pGJ2798; C-. DNA extraído de *N.oleoabundans* sin transformar.

No se observó amplificación en ninguno de los genes cuando se analizaron las colonias sin transformar empleadas como controles negativos.

Con el fin de corroborar que los fragmentos amplificados correspondían a los genes amplificados, se procedió a su purificación, clonado y posterior secuenciación. El análisis de las secuencias analizadas para los genes *gfp* y *nptII*, demostró que en ambos casos se correspondían con las secuencias depositadas en las bases de datos (NCBI).

Una vez determinada la inserción del T-DNA en el genoma de la microalga, se procedió a estudiar la presencia de la proteína GFP sintetizada por las colonias transformadas. No se observó fluorescencia de la proteína GFP en ninguna de las

colonias analizadas. Para asegurar que el gen *gfp* se había integrado completo en el genoma de las algas y corroborar que la ausencia de fluorescencia no era debida a una integración parcial del gen, se realizó una PCR de las colonias transformadas utilizando cebadores situados en el promotor y el terminador 35S. El resultado mostró un fragmento de 940 pb que coincide con el tamaño esperado para el gen *gfp* completo (Fig. 6).

Paralelamente la no amplificación del gen *aadA* en las muestras de los transformantes, descartó la presencia de *A. tumefaciens* en todas las colonias analizadas (Fig. 7).

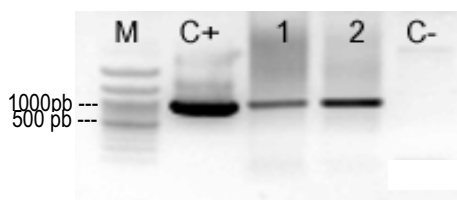


Figura 6: Amplificación del gen completo *gfp* mediante los cebadores situados en el promotor y el terminador 35S. 1-2. DNA extraído de colonias transformadas; C+. vector binario pGJ2798; C-. DNA extraído de *N.oleoabundans* sin transformar.

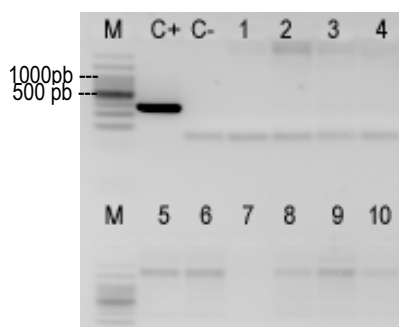


Figura 7: Detección del gen *aadA* mediante amplificación por PCR en DNA extraído de colonias transformadas y obtenidas tras la infección con *A. tumefaciens*. 1-10. DNA extraído de colonias transformadas; C+. vector binario pGJ2798; C-. DNA extraído de *N.oleoabundans* sin transformar.

Tabla 7: Resumen de las condiciones de los ensayos de transformación y los resultados obtenidos en cada caso.

Ensayo	Cepa	D0 ₆₀₀	MI		Soporte	Condiciones de Cocultivo				Nº células sembradas	Eficiencia transformacion ^a	Colonias estables en tiempo (%)	Tiempo de mantenimiento resistencia (meses)
			AS (µM)	pH		Medio	T ^a (°C)	Tiempo (horas)	Luz/Osc				
1	AGL1	0,55	100	7	Filtro	TAP + AS	22	24	O	4,50E+06	< 1	100	12
								48					
								72					
	EHA105	0,33	100	7	Filtro	TAP + AS	22	24	O	4,50E+06	< 1	0	
								48					
								72					
2	LBA4404	0,3	100	7	Filtro	TAP + AS	22	24	O	4,50E+06			
								48					
								72					
3	AGL1	0,52	200	5,8	Filtro	TAP + AS	22	48	O	4,00E+06	1-2	65	9
							25				< 1		
3	AGL1	0,58	200	5,8	Agar	TAP	22	48	L	3,00E+06	30	82	3

^aNumero de colonias resistentes a kanamicina por millón de células sembradas.

5. Discusión

El estudio de la biología de *Agrobacterium tumefaciens*, junto con el desarrollo de la ingeniería genética y su aplicación a la biología vegetal, han revolucionado la agricultura y contribuido al crecimiento de la industria biotecnológica (Teli & Timko, 2004). Aunque la aplicación de la ingeniería genética al campo de las microalgas es muy reciente, no obstante, alrededor de treinta especies ya han sido modificadas genéticamente con mayor o menor éxito mediante diferentes técnicas de transformación. En tan sólo dos de estas especies se ha empleado *A. tumefaciens* para la transferencia de genes. En este trabajo se presenta la tercera evidencia de transformación estable de microalgas mediante infección con *A. tumefaciens*.

La transferencia del T-DNA es un proceso conocido y regulado, cuyo éxito depende de múltiples factores relacionados tanto con la propia bacteria como con el material vegetal a infectar (Valderrama *et al.*, 2005; Birch, 1997; Potrycus, 1991). Se ha demostrado que la expresión de los genes *vir*, indispensables para iniciar el proceso de infección de *A. tumefaciens*, está afectada por numerosos factores como las condiciones físico-químicas del medio de cultivo, la presencia de compuesto fenólicos como AS, o el tiempo de contacto de *Agrobacterium* con el huésped (Rámirez *et al.*, 2009).

En este trabajo, el aumento de la concentración de AS combinado con la acidificación del medio de cultivo de *A. tumefaciens*, resultó en un incremento de la frecuencia de transformación respecto a la obtenida cuando la bacteria se cultiva con menor concentración de AS y un pH de 7. Se ha descrito que el pH ácido en el medio de cultivo induce la expresión de los genes *vir* de *A. tumefaciens* (Lin *et al.*, 2008; Kumar & Rajam, 2007). Del mismo modo, la adición de AS se suele relacionar con una mayor virulencia de *A. tumefaciens*, aunque esto no es indispensable cuando las propias células liberan compuestos fenólicos, tal como ocurre con los sistemas vegetales (Gelvin, 2000).

En relación a la temperatura, Dillen *et al.* (1997) indican que la temperatura óptima para la infección de células vegetales con *A. tumefaciens* es de 22°C. Esta temperatura también es empleada para la transformación de las algas *C. reinhardtii* (Kumar *et al.*, 2004) y *H. pluviales* (Kathiresan *et al.*, 2009). Nuestros resultados están de acuerdo con lo anterior, ya que la frecuencia de células transformadas cuando el co-cultivo se llevó a cabo a 22° C fue 6 veces superior a la obtenida empleando una temperatura de 25 °C.

Sin embargo, en el desarrollo de este trabajo se ha observado que el factor determinante en la mejora de la eficiencia de la transformación es el empleo de irradiación durante el periodo de cocultivo para la infección. Cuando el periodo de cocultivo se realiza bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz, la frecuencia de transformación obtenida se incrementa más de 15 veces respecto a los experimentos en los que el cocultivo se realiza en oscuridad.

A pesar de que la mayoría de los protocolos de transformación mediada por *A. tumefaciens* se desarrollan en condiciones de oscuridad, apenas existen trabajos en los que se haya analizado el efecto de la irradiación sobre la infección con *A. tumefaciens*, y las ventajas de realizar el cultivo en oscuridad no han sido fundamentadas en casi ningún caso.

Es por tanto esperable que algunos de los factores que influyen sobre el proceso de infección se vean modificados por la luz y entonces podrían influir en el proceso de infección. Esto parece especialmente lógico en el caso de las células vegetales, ya que la luz influye sobre las células alterando los niveles hormonales y de otros compuestos químicos, fomentando la proliferación celular y afectando a la etapa del ciclo celular. Estos factores podrían ser determinantes sobre la competencia de las células para ser infectadas por *A. tumefaciens*.

La influencia de la irradiación sobre la infección de tejidos celulares vegetales ha sido comprobada por Zambre *et al.*, 2003. Estos autores describen un evidente efecto positivo de la luz sobre la transferencia de genes mediante *Agrobacterium* a las células de *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus acutifolius*, independientemente de la duración del proceso de cocultivo, y del tipo de plasmido Ti de *Agrobacterium*. Otra evidencia de la importancia que puede alcanzar este factor se ha descrito para células de tabaco, en las que se observa una inhibición de la capacidad de *A. tumefaciens* para infectar en oscuridad, debido al cierre de las estomas (Escudero & Hohn, 1997).

La frecuencia de transformación obtenida, en base al fenotipo de resistencia a kanamicina empleando el protocolo desarrollado en este trabajo es de 30 colonias por cada 10^6 células sembradas, 10 veces inferior a la obtenida previamente en la transformación de la microalga *C. reinhardtii* y 5 veces inferior a la obtenida en *H. pluvialis* mediante *A. tumefaciens* (Kumar *et al.*, 2004; Kathiresan *et al.*, 2009). Sin embargo la estabilidad de las células transformadas es hasta el momento alentadora, tal como se espera de esta técnica de transformación.

En experiencias previas de transformación de microalgas se han empleado un amplio número de promotores, marcadores de selección y genes informadores, algunos de ellos de origen heterólogo (Hallman, 2007). En la selección del plásmido empleado en el desarrollo de este trabajo, se tuvo en cuenta que todos estos elementos hubieran sido empleados con éxito en otras especies de microalgas, especialmente clorófitas.

El gen informador *gfp* se ha utilizado como marcador en la transformación de diversas especies, incluyendo las algas *C. reinhardtii* y *H. pluvialis* transformadas previamente con *A. tumefaciens*. Pese a ello no hemos podido confirmar emisión de fluorescencia verde en las células transformadas. El análisis de la secuencia del gen *gfp*, amplificado por PCR, demostró que su integración era completa, sin embargo la proteína correspondiente no pudo ser detectada mediante western Blot, ni mediante fluorescencia de la GFP al microscopio.

Los problemas para expresar genes heterólogos son uno de los principales obstáculos encontrados para el desarrollo de la transformación de microalgas (Fuhrmann *et al.*, 1999; Leon-Bañares *et al.*, 2004).

La ausencia de la proteína GFP podría deberse a un problema de silenciamiento génico provocado por modificaciones epigenéticas (Hallmann, 2007).

Otra posible causa sería la existencia de problemas de transcripción relacionados bien con la ausencia de secuencias reguladoras de transcripción, bien debidas que la secuencia de nucleótidos del transgén sea poco adecuada para la especie receptora, es decir que los codones preferidos por la especie transformada no coincidan con los del transgén (Hallmann, 2007; Fuhrmann *et al.*, 1999).

En la microalga *C. reinhardtii* la ausencia de expresión del *gfp* fue atribuida a la composición de codones. El elevado contenido de nucleótidos A/T en la secuencia del gen *gfp* (procedente de la medusa *Aequorea victoria*), idéntica a la que porta el vector pGJ2798 empleada en este trabajo, dificultó su procesamiento en una especie cuyos codones tiene un elevado porcentaje de nucleótidos G/C (Fuhrmann *et al.*, 1999). Sin embargo, este problema no ocurrió en la transformación de esta misma especie con *A. tumefaciens* descrita por Kumar *et al.*, (2004), para la que si se pudo demostrar la emisión de fluorescencia de la GFP por microscopia.

La ausencia de la expresión de la GFP también podría ser debida al promotor heterólogo *CaM35S* ya que no es un promotor funcional en muchas especies (Walker *et al.*, 2005) aunque se ha utilizado con éxito en algunas especies de algas.

Con el fin de mejorar la frecuencia de transformación será necesario realizar un experimento multifactorial que permita evaluar la influencia de otros factores como el tiempo de cocultivo u otras concentraciones de AS, bajo condiciones de irradiación.

6. Bibliografía

- Andersen, R.A. (2005): Algal culturing techniques, 578pp, *Elsevier Academic Press*, London.
- Becker, W. (1994) Microalgae: Biotechnology and Microbiology. *NY Cambridge University Press*.
- Becker, W. (2004) The nutritional value of microalgae for aquaculture. In Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. *Richmond A. (ed.) Blackwell Publishing, Oxford*.
- Birch, R.G. (1997) Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:297-326.
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B., Sanford, J.C. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.
- Cardozo, H.M., Guratini, T., Barros, M.P., Lopes, N.P., Campos, S. (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 60-78.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3): 294-306.
- Chow, K-C., Tung, W.L. (1999) Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. *Plant cell Reports* 18. 778-780.
- Clark, N.C., Olsvik, O., Swenson, J.M., Spiegel, C.A., Tenover, F. (1999) Detection of a Streptomycin/Spectinomycin adenyltransferase gene (aadA) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:157-160.
- Dawson, H.N., Burlingame, R., Cannons, A.C. (1997) Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Current Microbiology* 35: 356-362.
- Debuchy, R, Purton, S., Rochaix, J.D. (1989) The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: An important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO Journal* 8: 1803-2809.
- Dillen, W., de Clercq, J., Kapila, J., Zambre, M., Van Montangu, M., Angenon, G. (1997) The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. *Plant Journal* 12: 1459-1463.
- Dunahay, T.G. (1993) Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *Biotechniques* 15: 452-460.

- El-Sheekh, M.M. (1999) Stable transformation of the intact cells of *Chorella kessleri* with high velocity microprojectiles. *Biologia Plantarum* 42:209-216.
- Escudero, J., Hohn, B. (1997) Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *Plant Cell* 9: 2135-2142.
- Fernández, E., Schnell, R., Ranum, L.P., Hussey, S.C., Silflow, C.D., Lefebvre, P.A. (1989) Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc natl Acad Sci USA* 86: 6449-6453.
- Fuhrmann, M., Oertel, W., Hegemann, P. (1999) Asynthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 19 (3): 353-361.
- Gatenby, C.M., Orcutt, D.M., Kreeger, D.A., Parker, B.C., Jones, V.A., Neves, R.J. (2003) Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *Journal of Applied Phycology* 15: 1-11.
- Gelvin, S.B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:223-256.
- Gouveia, L., Oliveira, A.C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(2):269-274
- Hallmann, A. (2007) Algal transgenics and biotechnology. *Transgenic Plant Journal* 1(1): 81-98.
- Hellens, R., Mullineaux, P. (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in plant science* 5: 446-451.
- Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T., Chilton, M.D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in the region of pTiBo542 outside the T-DNA. *Journal Bacteriology* 168: 1291-1301.
- Jarvis, E.E., Brown, L.M. (1991) Transient expression of firefly luciferase in protoplast of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Current Genetics* 19:317-321.
- Kathiresan, S., Chandrashekar, A., Ravishankar, G.A., Sarada, R. (2009) *Agrobacterium*-mediated transformation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). *Journal phycology* 45:642-649.
- Kindle, K.L., Schnell, R.A., Fernandez, E., Lefebvre, P.A. (1989) Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *Journal of Cell biology* 109:2589-2601.
- Kindle, K.L. (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1228-1232.

- Kumar, S.V., Misquitta, R.W., Reddy, V.S., Rao, B.J. Rajam, M.V. (2004) Genetic transformation of the green alga-*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant science* 166: 731-738.
- Kumar, S.V., Rajam, M.V. (2007) Induction of *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Science* 92 (12): 1727-1729.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:6 80-685.
- Lan, C.Q., Wang, B. (2010) Microalgae for biofuel production and CO₂ sequestration. *Nova Science Publishers, Inc.*
- Lazo, G.R., Stein, P.A., Ludwig, R.A. (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* 9: 963-967.
- Lee, L-Y., Gelvin, S.B. (2008) T-DNA binary vectors and systems. *Plant physiology* 146:325-332.
- León-Bañares, R., González-Ballester, D., Galvan, A., Fernandez, E. (2004) Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends in Biothechnology* 22: 45-52.
- Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N. (2008) Biofuels from microalgae. *Biotechnol. Prog.* 24:815-820.
- Lin, J.J. (1995) Electrotransformation of *Agrobacterium*. *Electroporation protocols for microorganism*. Ed. Nickoloff J. 171-180. ISBN: 0-89603-310-4-1, Humana Press.
- Lin Y-H., Binns, A.N., Lynn, D.G. (2008) The initial steps in *Agrobacterium tumefaciens* pathogenesis: chemical biology of host recognition. *Agrobacterium: From Biology to biotechnology*. Springer.
- Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C. (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 99 (11):4717-4722.
- Lü, Y.M., Jiang, G.Z., Niu, X.L., Hou, G.Q., Zhang, G.X., Xue, L.X. (2005) Cloning and functional analyses of two carbonic anhydrase genes from *Dunaliella salina*. *Acta Genet Sin* 31:1157-1166.
- Maruyama, M., Horáková, I., Honda, H., Xing, X-H., Shiragami, N., Unno, H. (1994). Introduction of foreing DNA into *Chlorella saccharophila* by electroporation. *Current Microbiology* 38: 821-826.
- Muller-Freuga, A. (2004) Microalgae for aquaculture. In Handbook of microalgal culture: *Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond A. (ed.). Blackwell Publishing, Oxford
- Olaizola, M. (2003) Comercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering* 20:459-466.

- Ooms, G., Hooykaas, P.J.J., Van Veen, R.J.M., Van Beelan, P., Regensburg-Tuink, T.J.G., Schilperoort, R.A. (1982) Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* 7:15-29.
- Potrycus, I. (1991) Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 205-225.
- Pulz, O., Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:635-648.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., Posewitz, C. (2010) Genetic Engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic cell* 9 (4): 486-501.
- Ramírez, H., Lentini, Z., Vallejo Cabrera, F.A. (2009) Evaluación y selección de un protocolo vía *Agrobacterium* para la incorporación de resistencia al cogollero en la variedad de tomate Unapal-Arreboles. *Acta Agron (Palmira)* 58: 61-68.
- Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:430-436.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press*. ISBN 0-87969-309-6.
- Schiedlmeier, B., Schmitt, R., Müller, W., Kirk, M.M., Gruber, H., Mages, W., Kirk, D.L. (1994) Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 5080-5084.
- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., Usuda, H. (1998) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics* 148:1821-1828.
- Song, D., Fu, J., Shi, D. (2008) Exploitation of oil-bearing microalgae for Biodiesel. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24(3):341-348.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101(2):87-96.
- Steinbrenner, J., Sandmann, G. (2006) Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7477-7484.
- Sun, Y., Yang, Z., Gao, X., Li, Q., Zhang, Q., Xu, Z. (2005). Expresión of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. *Mol Biotechnol* 30: 185-192.

- Sun, Y., Gao, X., Li, Q., Zhang, Q., Xu, Z. (2006) Functional complementation of a nitrate reductase defective mutant of a green alga *Dunaliella viridis* by introducing the nitrate reductase gene. *Gene* 377: 140-149.
- Tan, C., Zhang, S., Jiang, P., Zhao, F. (2005) Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. *Journal of Microbiology* 43: 361-365.
- Teli, N.P., Timko, M.P. (2004) Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 79:125–145.
- Tornabene, T.G., Holzer, G., Lien, S., Burris, N. (1983) Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microbial technology* 5: 435-440.
- Valderrama, A.M., Arango, R. and Afanador, L. (2005) Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería genética natural aplicada”. *Rev Fac Nat Agr Medellin* 58:2569-2585.
- Walker, T.L., Purton, S., Becker, D.K., Collet, C. (2005) Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep* 24: 629-641.
- Zaslavskaya, L.A., Lippmeier, J.C., Shih, C., Ehrhardt, D., Grossman, A.R., Apt, K.E. (2001). Trophic Conversion of an Obligate Photoautotrophic Organism Through *Metabolic Engineering*. *Science* 292: 2073-2075.
- Zambre, M., Terry, N., De Clercq, J., De Buck, S., Dillen W., Van Montagu, M., Van Der Straeten, D., Angenon, G. (2003) Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Planta* 216: 580-586.